

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-505535

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)6月22日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 Q 1/68	Z N A A	9453-4 B	
C 0 7 H 21/04	B	8615-4 C	
C 1 2 N 15/09		9281-4 B	C 1 2 N 15/ 00 A
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 10 頁)			
(21)出願番号	特願平6-516767		
(86) (22)出願日	平成6年(1994)1月31日		
(85)翻訳文提出日	平成6年(1994)9月29日		
(86)国際出願番号	P C T / F R 9 4 / 0 0 1 2 2		
(87)国際公開番号	W O 9 4 / 1 7 2 0 5		
(87)国際公開日	平成6年(1994)8月4日		
(31)優先権主張番号	9 3 / 0 0 9 7 8		
(32)優先日	1993年1月29日		
(33)優先権主張国	フランス (F R)		
(81)指定国	E P (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), C A, J P, U S		
(71)出願人	アンスティチュ バストゥール フランス国 75724 バリ セデックス 15 リュ・デュ・ドクトゥールールー 28		
(72)発明者	ゲスドン, ジャンールユク フランス国 92310 セブレ グランーリ ユ 33		
(72)発明者	ストネ, ヴェロニク フランス国 92600 アスニエール リュ ドゥ ラ サブリエール 24		
(74)代理人	弁理士 越場 隆		

(54)【発明の名称】 カンピロバクター・ジジニ (Campylobacter jejuni) のゲノムの核酸の塩基配列と特異的にハイブリダイズするヌクレオチド配列

(57)【要約】

ヌクレオチド配列No. 1、ヌクレオチド配列No. 2、これらの相補的な配列およびこれらの配列の少なくとも1つの塩基の突然変異、挿入、欠失または置換に起因して変化した配列との中から選択されるCampylobacter jejuniのゲノムの核酸配列と特異的にハイブリダイズするヌクレオチド配列。これはその他のCampylobacter種の核酸とはほとんどハイブリダイズしない。この配列の断片はCampylobacter jejuniに特異的な配列の増幅用の特異的プライマーまたはCampylobacter jejuniの核酸配列に特異的な核酸プローブとして使用できる。本発明は生物試料中のCampylobacter jejuni株の存在を検出する方法とそれに用いるキットを対象とする。

請求の範囲

1. *Campylobacter jejuni*のゲノムの核酸塩基配列と特異的にハイブリダイズするヌクレオチド配列において、
ヌクレオチド配列No.1と、これと相補的な配列と、この配列の少なくとも1つの塩基の突然変異、挿入、欠失または置換に起因して変化した配列との中から選択されることを特徴とする塩基配列。
2. 請求項1に記載のヌクレオチド配列の全部または一部を含むヌクレオチド配列。
3. ヌクレオチド配列No.2と、これと相補的な配列と、この配列の少なくとも1つの塩基の突然変異、挿入、欠失または置換に起因して変化した配列との中から選択される請求項1に記載のヌクレオチド配列を有するヌクレオチド配列。
4. 請求項1～3のいずれか一項に記載の配列の1つの増幅生成物。
5. 請求項1～3のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列を含むことを特徴とするクローニングベクター。
6. 請求項1～4のいずれか一項に記載のヌクレオチドより選択された少なくとも20の連続するヌクレオチドを有することを特徴とする *Campylobacter jejuni* の核酸に対して特異的な核酸プローブ。
7. ヌクレオチド配列No.1と、ヌクレオチド配列No.2と、これらの相補的な配列と、これらの配列の少なくとも1つの塩基の突然変異、挿入、欠失または置換に起因して変化した配列との中から選択される請求項6に記載の *Campylobacter jejuni* の核酸に対して特異的な核酸プローブ。
8. 担体上に固定されてキャプチャープローブとして使用される請求項6または7に記載の核酸プローブ。
9. 請求項1～4のいずれか一項に記載の配列より選択されるヌクレオチドを18～30個、好ましくは18～22個有するオリオヌクレオチドペアで構成されることを特徴とする *Campylobacter jejuni* の核酸配列の増幅に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーペア。

$$\begin{array}{l} \text{5' GAA TGA AAT TTT AGA ATG GGG 3'} \\ \text{3' GAT ATG TAT GAT TTT ATC CTGC 5'} \end{array}$$
10. 下記配列を有するオリゴヌクレオチドペアで構成されることを特徴とする請求項9に記載の *Campylobacter jejuni* の核酸配列の増幅に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーペア：

$$\begin{array}{l} \text{5' GAA TGA AAT TTT AGA ATG GGG 3'} \\ \text{3' GAT ATG TAT GAT TTT ATC CTGC 5'} \end{array}$$
11. 下記段階を特徴とする生物試料中の *Campylobacter jejuni* の存在を検出する方法：
 - a) 生物試料と請求項9または10に記載のプライマーペアとをプライマーが *Campylobacter jejuni* の核酸にハイブリダイズするような条件下で接触させ、この場合、必要に応じて、生物サンプル中に含まれる *Campylobacter jejuni* の核酸を予めハイブリダイゼーションし易い状態としておき、

のいずれか一項に記載の核酸プローブの使用。
12. 下記段階を特徴とする食物試料中の *Campylobacter jejuni* の存在を検出する方法：
 - a) 低速遠心分離で粗食物組織を除去し、
 - b) 食物試料と請求項9または10に記載のプライマーペアとをプライマーが *Campylobacter jejuni* の核酸にハイブリダイズするような条件下で接触させ、この場合、必要に応じて、食物サンプル中に含まれる *Campylobacter jejuni* の核酸を予めハイブリダイゼーションし易い状態としておき、
 - c) *Campylobacter jejuni* に属する核酸を増幅させ、
 - d) プライマーを両側に有する断片に対応する *Campylobacter jejuni* の核酸の断片が増幅されたことを検出する。
13. 下記要素を有することを特徴とする生物試料中または食物試料中の *Campylobacter jejuni* の存在を検出するためのキット：
 - 1) 請求項9または10に記載のプライマーペア、
 - 2) *Campylobacter jejuni* の核酸を増幅させる試薬、
 - 3) 必要に応じて増幅した断片の配列を確認するもの、特に、請求項6～8に記載の核酸プローブ。
14. *Campylobacter jejuni* 株を特定の *Campylobacter jejuni* 株として特定・分類するための疫学的手段としての請求項6～8

カンピロバクター・ジューニ(Campylobacter jejuni)のゲノムの核酸の塩基配列と特異的にハイブリダイズするヌクレオチド配列

本発明はカンピロバクター・ジューニ(以下 Campylobacter jejuni または C. jejuni と表記する)に特異的な核酸の塩基配列と、この塩基配列を用いて生物サンプル中の Campylobacter jejuni の DNA または RNA を増幅させるためのヌクレオチドプライマーとしての Campylobacter jejuni の配列またはその断片を検出するための特異的なヌクレオチドプローブとしての応用に関するものである。

カンピロバクター感染症は世界中で人および野生動物または家畜の両方に広く広がっている感染症である。

現在カンピロバクター(Campylobacter)と呼ばれるこのバクテリアは20世紀初頭には発見されていたが、同定および培養が困難であったため長い間無視されてきた。最初に羊および牛から単離された当時は Vibrio fetus と呼ばれ、Campylobacter fetus と呼ばれるようになったのは後である。人間で最初のカンピロバクター症例が報告されたのは1946年のことであるが、カンピロバクター感染症の重大さが実証され、認識されるようになったのはカンピロバクター用の選択的培地が開発され始めた1972年からである。

Campylobacter fetus 型の種が命名されて以来、その他の種および亜種が12種類の発見された。その正確な数字は命名者および分類法によって変わる。多くの場合、全く新規な分類基準が提案される。

これらの動物は病気に罹っているか健康キャリアーであるかに係わらず巨大な保菌宿主を構成しているので、感染の危険は高い。牛および羊での明らかな感染ケースで C. jejuni が「家畜赤痢(dysenterie du bétail)」の原因であることは1931年の最初の報告から知られている。その結果、家畜への影響だけではなく、微生物が動物の周囲(地面や水)に蔓延して人間に入る危険がある。無症候動物すなわち「健康キャリアー」の場合でも、これら動物やその排泄物に直接接触したり、汚染された食物や水(調製時に汚染された肉や十分に調理されていない肉や低温殺菌されていない牛乳、汚染された水等)を飲食すると、人間に入ることになる。

従って、病原である C. jejuni を一日でも早く同定することは、適当な方法で人と動物の両方でのコンタミネーションを防ぐために予防的側面から極めて重要である。特に、無菌状態の必要とする食品業界の場合に重要である。また、C. jejuni に感染した患者の治療後の正しいモニタリングや再発の完全予防の点で人間の病理学でも重要である。

さらに、感染時に感染の進行と伝染・伝播を防ぐための適切な効果的な処置が行えるようにするためには、原因となる微生物を発病後に迅速かつ正確に同定することが極めて重要である。

しかし、カンピロバクターの同定とその関連種の決定は容易ではない。すなわち、従来法では、単離に特別な培地を必要とし、少なくとも48時間培養して濃縮してからでないとこの微生物は検出できない。この時間は迅速な診断を必要とする場合には長過ぎる時間である。また、現在の微生物学的診断は異種間存在する表現型の違いを利用する細菌学および/または生化学的手法であり、所定の特性に対して突然変異体が現れた場

合には診断ミスとなる危険性がある。C. jejuni と C. coli とを区別する唯一の基準は馬尿酸塩を加水分解するか否かであり(C. jejuni は加水分解できるが、C. coli はできない)、区別不可能ということも起り得る。事実、馬尿酸塩に対して陰性の C. jejuni 株も存在する(Hebert 達、J. Clin. Microbiol., 1984, 20, 138-140, Totten 達、J. Clin. Microbiol., 1987, 25, 1747-1752)。

1986年にフランスで設立された「カンピロバクター感染症監視ネットワーク(reseau de surveillance nationale des infections aCampylobacter)」は、報告例についての疫学的データおよび臨床データのレジメを毎年発行している。例えば、1988年、1989年および1990年ではこの感染症に関連があるとされた種で最も多かったのは C. jejuni であった(分析したケースの60~75%)。

人間の腸での C. jejuni 感染症の主要な症状は下痢であり、最も深刻なケースでは重度の脱水症状となり、脱水症に対して弱い子供と幼児には特に危険である。しかし、多くの場合、C. jejuni による腸炎は合併症を起こさないまま一週間後に自然に止まる。しかし、糞便培養結果は数週間後あるいは一ヶ月後でも陽性のままであり、5~10%のケースは再発する。すなわちカンピロバクターは人の体内で日和見バクテリア的に挙動するので、免疫が抑制されている人および深刻な疾病を持つ人(エイズ、肝硬変、癌、白血病等の患者)の場合には徹底した処置と監視が必要がある。

上記以外に C. jejuni 感染結果として報告されているものには腸間膜腺炎、胆嚢炎、泌尿器感染、髄膜炎、敗血症、結節性紅斑またはギラン・バレー症候群などであるが、これらは例外的かつ稀なケースである。

動物ではカンピロバクターは通常共生生物として牛、羊、豚、家禽、野生の鳥、犬および猫等の多くの種の消化管内に住んで

合には診断ミスとなる危険性がある。C. jejuni と C. coli とを区別する唯一の基準は馬尿酸塩を加水分解するか否かであり(C. jejuni は加水分解できるが、C. coli はできない)、区別不可能ということも起り得る。事実、馬尿酸塩に対して陰性の C. jejuni 株も存在する(Hebert 達、J. Clin. Microbiol., 1984, 20, 138-140, Totten 達、J. Clin. Microbiol., 1987, 25, 1747-1752)。

C. jejuni 種の同定に分子ハイブリダイゼーションを用いる方法は既に提案されている。しかし、公知の方法は培養後にしか同定が行えず、生物試料中でこのバクテリアを検出するには感度が不十分である。そのため、放射能プローブ(Ng 達、Mol. Cell. Probes, 1987, 1, 223-243)を用いたり、非放射能プローブ(Chevrier 達、J. Clin. Microbiol., 1989, 27, 321-326)を用いたカンピロバクターの同定・分離方法が提案されたが、これらの方法では全ゲノムプローブを使用する必要があり、しかも、検出感度が約 10^5 バクテリアと非常に高いために培養による濃縮が必要である(Chevrier 達、上記)。

種を判定するためにピッケン達(Picken et. al, Mol. Cell. Probes, 1987, 1, 245-259)、コロリク達(Korolik et. al, J. Gen. Microbiol., 1988, 134, 521-529)およびズーとワング(Zhou and Wang (Zbl. Bakt., 1989, 272, 186-190)は C. jejuni の特異的な核酸プローブを研究したが、特異性の問題は残っており、プローブとなる可能性のある配列は決定されていない。同様に、アルカリホスファターゼに結合したオリゴマーで構成された別の C. jejuni の「特異的」プローブも報告されている(Jablonski et. al., N.A.R., 1986, 14, No.15)配列は公開されていない。しかし、この特異性は C. jejuni 由来の断片についてテストされているのみで、C. jejuni とカンピ

ロバクター属のその他の種のゲノム全体に対してはテストされていない。

最近、*C. Coli* VC167 の *fla A* 遺伝子から選択したオリゴヌクレオチドを用いて PCR によって *C. jejuni* を同定する方法が報告された (Oyoko et al., J. Clin. Microbiol., 1992, 30, No. 10, 2613-2619)。しかし、この方法では *C. Coli* と *C. jejuni* とを区別することができない。

本発明人は、*Campylobacter jejuni* 種に特異的な検出法に使用可能な核酸の塩基配列を単離した。

従って、本発明の対象は、*Campylobacter jejuni* のゲノムの核酸塩基配列と特異的にハイブリダイズするヌクレオチド配列において、ヌクレオチド配列 No. 1 と、これと相補的な配列と、この配列の少なくとも 1 つの塩基の突然変異、挿入、欠失または置換に起因して変化した配列との中から選択されることを特徴とする塩基配列にある。

本発明の他の対象は、上記のヌクレオチド配列の全部または一部を含むヌクレオチド配列、特にヌクレオチド配列 No. 2 と、これと相補的な配列と、この配列の少なくとも 1 つの塩基の突然変異、挿入、欠失または置換に起因して変化した配列との中から選択されるヌクレオチド配列を有するヌクレオチド配列にある。

「少なくとも 1 つの塩基の突然変異、挿入、欠失または置換に起因して変化した配列」とは、サンプルク、フリーシュ、およびマニアスが定義した通常のストリンジェンシーの条件 (SAMBRON J., FRITSCH B.P. and MANIATIS T.: Molecular Cloning (1989), A Laboratory Manual, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory 9, 47-9, 62) 下で、配列 No. 1、配列 No. 2 またはこれらと相補的な配列とハイブリダイズする配列を意味す

る。この条件は培地のストリンジェンシー温度 T_m で決まる。

最も有利な配列は ($T_m = 15^\circ\text{C}$) から ($T_m = 20^\circ\text{C}$) の温度範囲でハイブリダイズする配列である。

本発明の配列は少なくとも 12 個のヌクレオチドを有するのが有利である。

本発明のさらに他の対象は、上記で定義の配列の増幅生成物 (produits d'amplification) にある。

本発明のさらに他の対象は、上記定義のヌクレオチド配列を含むクローニングベクターにある。

上記定義のヌクレオチド配列は DNA 配列でも RNA 配列でもよい。

配列 No. 1 の断片の正確なサイズは 147 bp である。この配列は *C. jejuni* 種に対して特異的で、カンピロバクター属のその他の 8 つの代表的な種とはハイブリダイズしない。

配列 No. 2 の断片の長さは 1,189 bp で、*C. coli* と極めて軽くハイブリダイズするが、試験を行ったその他 7 つのカンピロバクター種とはハイブリダイズしない。

データベース「Genebank」および「EMBL」を検索したが、配列 No. 1 および配列 No. 2 と公知 DNA 配列との間には類似性は全くなかった。

配列 No. 1 および配列 No. 2 は、機能的に均等な部分または変体で、*Campylobacter jejuni* を検出および同定するための分子ハイブリダイゼーション法で用いることができる。

機能的に均等な変体には、これらの断片の特異性に必須な特性を損わずに塩基対が突然変異、欠失、挿入または置換された配列が含まれる。

本発明のヌクレオチド配列は医学および獣医学における診断および疫学的用途で、特に *Campylobacter jejuni* の特異的な

核酸プローブまたは *Campylobacter jejuni* の特異的配列の増幅 (amplification) 用のオリゴヌクレオチドプライマーとして用いることができる。

本発明プローブは上記配列または配列の断片中に少なくとも 20 の連続したヌクレオチドを含んでいるのが有利である。このプローブは DNA プローブか RNA プローブである。

本発明のヌクレオチド配列は、生物試料中の *Campylobacter jejuni* を特異的かつ直接的な方法で特異的に検出するためのプローブとして使用することができる。このプローブはバクテリアが属する生物型とは無関係に *Campylobacter jejuni* 種のバクテリアを検出することができる (*C. jejuni* 種のバクテリアは尿酸酸塩を加水分解して H_2S と DMS とを産生する能力に応じて I、II、III および IV 型とよばれる 4 つに分類されるの "lor biotype" が存在する)。

本発明オリゴヌクレオチドプローブは亜種である *C. jejuni* subsp. *doylei* も検出することができる。

本発明のオリゴヌクレオチドプローブは *C. jejuni* と同じ生物試料中に存在する可能性のあるその他の種類: *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* および *Streptococcus agalactiae* に属するバクテリアからの DNA を検出することはない。

ラベルしていない配列をプローブとして直接使用することができるが、通常は、多くの用途で使用するプローブとするために、配列を放射性元素 (^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{125}I) または非放射性分子 (ビオチン、アセチルアミノフルオレン、ジギシゲニン、5-プロモデオキシウリジン) でラベル化する。

後者の場合には、フランス国特許第 2,422,956 号および第 2,518,755 号に記載のラベル方法のいずれかを用いることができ

る。ハイブリダイゼーションは種々の方法で行うことができる (Matthews, J.A. and Kricka, L.J., Anal. Biochem. 1988, 169, 1-25)。最も広く採用されている方法は *Campylobacter jejuni* の細胞から抽出した核酸を担体 (ニトロセルロース、ナイロン、ポリスチレンなど) に固定し、固定した核酸とプローブとを所定の条件下で培養する方法である。ハイブリッド化させた後、過剰なプローブを除去し、形成されたハイブリッド分子を適当な方法で検出する (プローブの放射能、蛍光活性または酵素活性を測定する等)。

本発明の核酸プローブはキャプチャープローブ (sondes de capture) として使用することもできる。この場合にはプローブを担体に固定し、*C. jejuni* から抽出した標的核酸を特異的ハイブリダイゼーションによって捕獲する。必要な場合には、固体担体を試料から分離し、キャプチャープローブと標的核酸との間に形成されたデュプレックス (duplex) を、検出が容易な元素でラベルした第 2 の検出プローブを用いて検出する。

分析試料から十分な量の *Campylobacter jejuni* の核酸が抽出できる場合には上記配列を用いて分析試料から *Campylobacter jejuni* に属する株を直接同定することができる。そうでない場合には、*Campylobacter jejuni* から核酸を抽出する前に液体培地中で迅速に培養するか、試料から抽出できる少量の *Campylobacter jejuni* の核酸を増幅 (amplification)、例えば PCR 法で増幅する。

オリゴヌクレオチドプライマー (amplification oligonucleotides) 特に PCR 法用のプライマーは、配列 No. 1、配列 No. 2 またはこれらの配列の断片から選択することができる。

この増幅法では増幅すべき断片の両側に付ける (encadrant) オリゴヌクレオチドペアを選択する必要がある (米国特許第 4,

663,202号)。このオリゴデオキシリボヌクレオチドまたはオリゴリボヌクレオチドのプライマーの長さは18~30、好ましくは18~22ヌクレオチドであるのが有利である。2つのプライマーの中の1方は鎖型の(+)鎖と相補的、他方のプライマーは(-)鎖と相補的である。これらのプライマーが二次構造または互いに相補的な配列を含まないことが重要である。また、各プライマーの配列の長さはプライマーが原核細胞または真核細胞、特にjejuni種に属さないカンピロバクター由来の核酸および試料中に入り込む可能性のある人間のDNAまたはRNAとハイブリダイズしないような長さを選択しなければならない。

Campylobacter jejuni株の塩基配列の増幅用の特異的プライマーとして選択されるアンプリマーは例えばグリフェイス達の方法に従って選択される(Griffais et al., Nucleic Acids Res. 1991, 19, 3887-3891)。

本発明者達はPCR法用に配列No.2からのオリゴヌクレオチドを選択した。このオリゴヌクレオチドを用いることによってCampylobacter jejuniが特異的に増幅され、その他のカンピロバクター種由来の核酸の増幅は見られなかった。

特に最も好ましいプライマーペアは配列No.2由来の下記配列のオリゴヌクレオチドVS15およびVS16である：

VS15: 3' GAA TGA AAT TTT AGA ATG GGG 3'

VS16: 3' GAT ATG TAT GAT TTT ATC CTGC 3'

増幅された断片はアガロースまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動またはキャピラリー電気泳動を行って同定するか、クロマトグラフィー法(ゲル透過、疎水性クロマトグラフィーまたはイオン交換体クロマトグラフィー)を行って同定することができる。増幅特異性はプローブとしてヌクレオチド配列No.1または配列No.2、その断片、これらの配列またはその断片を含

上記定義の核酸プローブ。

このキットはラベル化されたまたはラベル化されていないプローブを含んでいるのがさらに好ましい。これらは溶液状態でも、担体に固定されていてもよい。キットにさらにバクテリアの培養および標的核酸の抽出に必要な試薬と、選択した方法に対応したハイブリッド化溶液および洗浄液を含めることもできる。

本発明のさらに他の対象は、上記定義の核酸プローブの疫学的道具としての分子疫学での利用にある。

実際、C. jejuniのゲノム中に特定の断片が数回存在する場合、この反復性は同一の株の同定・分類の道具となり、その根拠と感染の伝播との関連を調べることができる。

以下、本発明の実施例を説明する。

添付図面は配列No.2(断片VS1)の配列決定手法を示している。

実施例1

C. jejuni ゲノムライブラリーの作成と、ライブラリーのスクリーニングと、特定断片の配列決定

パスツール研究所(Pasteur Institute Collection)提供のC. jejuni CIP 70.2由来のゲノムDNAを制限エンドヌクレアーゼHind IIIを用いて部分的に切断する。メーカーの推奨するバッファー中で37℃で1時間、DNA 1 µg当たり0.06Uの酵素を反応させる。こうして切断されたゲノムDNAを0.5%アガロースゲル上で電気泳動で分離し、長さ30~40kbの断片を電気的に溶出させ、フェノール/クロロホルム(1/1)で抽出した後、エタノール中で沈澱させる。

ベクターはベーリンガー社(Boehringer)から提供されたコ

ムプラスミド、これらの配列またはその配列の断片と相補的なオリゴヌクレオチドまたは増幅生成物を用いた分子ハイブリダイゼーションによって管理することができる。これらのプローブは放射性元素または非放射性分子でラベルされていても、されていなくてもよい。

本発明のさらに他の対象は、下記段落を特徴とする生物試料中のCampylobacter jejuniの存在を検出する方法にある：

- i) 生物試料とプライマーと呼ばれるオリゴヌクレオチド断片のペアとを、プライマーがCampylobacter jejuniの核酸にハイブリダイズするような条件下で接触させ、この場合、必要に応じて、生物サンプル中に含まれるCampylobacter jejuniの核酸を予めハイブリダイゼーションし易い状態としておき、
- ii) Campylobacter jejuniに属する核酸を増幅させ、
- iii) プライマーを両側に有する断片に対応するCampylobacter jejuniの核酸の断片が増幅されたことを検出し、
- iv) 特異的プローブのハイブリダイゼーション、シーケンシングまたは制限部位分析等によって増幅された断片を必要に応じて破砕する。

アガロースゲルを用いた場合のPCR増幅後の検出限界は、C. jejuniのバクテリア懸濁液を10倍に順次希釈して増幅した時に1バクテリアである。

本発明のさらに他の対象は、下記要素を有することを特徴とする生物試料中のCampylobacter jejuniの存在を検出するためのキットにある：

- 1) 上記で定義のオリゴヌクレオチド断片のペア、
- 2) Campylobacter jejuni株に由来する核酸を増幅させる試薬、
- 3) 必要に応じて増幅した断片の配列を確認するもの、特に、

スミド ref. pH7.9 である。これを同様の方法で切断し、セルフリゲーションを完全に避けるために脱リン酸化する。

リゲーションは、700ngのベクターと30/40kbのDNA断片1.5 µgとを混合し、この混合物に適当なバッファーに入れたT4 DNAリガーゼIユニットを添加した後、14℃で18時間放置して行った。

粗み換えコスミドをインビトロでカプセル化し、バクテリア(E. coli HB 101)の形質転換に使用する。形質転換されたバクテリアはLB培地で37℃で1時間培養した後、25 µg/mlのアンピシリンを含む選択的アガー培地に置く。アンピシリン耐性のコロニー全に対してテトラサイクリンに対する感受性テストする(30/40kbのDNA断片はテトラサイクリン(Tet)耐性遺伝子を不活化してアンピシリン(Amp)耐性遺伝子を保存するようにベクターに挿入される)。

アルカリ溶融法でアンピシリン耐性(Amp^r)且つテトラサイクリン感受性(Tet^s)の最初の形質転換コロニー60個から小規模にDNA調製する。この調製物からのDNAを制限エンドヌクレアーゼHind IIIで切断し、0.8%アガロースゲル上で電気泳動分析し、次いでナイロンフィルター上に移す。DNAを254nmの紫外線に3分間曝して不可逆的に固定する。

各フィルターを、10%のデキストラン硫酸、濃縮されたデンハルド5X溶液(Denhardt's solution)(1Xのデンハルド溶液は0.02%のFicoll、0.02%のポリビニルピロリドンおよび0.02%の牛血清アルブミンに相当する)、10 mMのEDTA、0.5%のSDS、100 µg/mlの変性されたサケ精子DNAおよび下記3つの種：

- C. jejuni CIP 70.2、
- C. coli CIP 70.80 および

C. fetus subsp. fetus CIP 5396

のいずれかを「マルチプライミング (多重増幅、amercage multiple)」で³²Pで放射性化したゲノムDNAを含む6XのSSCバッファー (1XのSSCは0.15 Mの塩化ナトリウムおよび0.015 Mのクエン酸ナトリウムとに相当する) 中で、65℃で16~18時間培養する。

ハイブリダイゼーション後、フィルターを例えば65℃の2XSSCで10分間づつ2回、65℃の2XSSC+0.1%のSDSで30分間1回、最後に65℃に0.1XのSSCで10分間1回洗浄する。湿ったままのフィルタを増感板を用いて-80℃で15分から3日間オートラジオグラフィーにかける。

このハイブリダイゼーションの結果、VS1と名付けられる約1.2 kbの断片を含むコスミドのクローンが単離される。この断片をベクター pUC18 (ベリンガー社から市販) でクローニングして大量調製する。得られたプラスミドを pVS 20 と名付けた。

この断片の特異性は実施例2に記載の方法で確認した。

上記VS1断片を W13mp18フェージでクローニングし、シーケンシングキット「シーケナーゼ」(登録商標 Sequenase 2.0、米国、バイオケミア社 (Biochemia Corporation) 製) を用いてサンガー (Sanger) 法で配列決定した。断片 VS1の幾つかの部分は、2本のDNA鎖をアルカリ変性した後プラスミド pVS20で直接配列決定された。シーケンシング反応は全て³²Sでラベル化したdATPを用いて行った。

添付の線図は断片 VS1のシーケンシングに用いた手法を示すもので、2、3、4、5、6、7、14、16、17、18はシーケンシングで用いた各種プライマーを示している。FPおよびRPは pUC18および W13mp18のDNAに共通な相補的プライマーで

カンピロバクター属に属さないバクテリアからのDNA

上記バクテリアと陽性コントロールとして用いたC. jejuniとのDNAを制限酵素 Hind III で加水分解し、得られた断片をアガロースゲル電気泳動で分離し、ナイロン膜 Hybond-N へと移した。各DNA断片をベリンガー社の「Random primed DNA Labelling」キットの指示に従って、³²Pでラベル化されたVS1断片をプローブとして用いた分子ハイブリダイゼーションで分析した。オートラジオグラフィーで検出された唯一の種はC. jejuniであった。カンピロバクター種以外のDNAでは72時間暴露後でもハイブリダイゼーションは全く検出されなかった。

C. jejuni 以外のカンピロバクター属由来のバクテリアのDNA

カンピロバクター種を適当な培地 (5%の羊血液アガー、バイオメリュール (Biomérieux) 社) で培養した後、以下の方法で処理する。

各ベトリ皿からバクテリアを2 mlのTE-グルコースバッファー (25 mM のpH8 トリス塩酸、10 mM のEDTA、50 mM のグルコース) を用いて回収し、5,000 gで5分間遠心分離する。ケーキを再度懸濁し、TE-グルコースで洗浄し、再度遠心分離する。バクテリアを100 μlのTEバッファー (10 mM のpH8 のトリス塩酸、1 mMのEDTA) に再懸濁し、ピッチャー達の方法でDNAを抽出する (Pitcher et. al., Lett. Appl. Microbiol., 1989, 8, 151-156)。抽出したDNAを酵素Hind IIIを用いて完全に切断する。得られた断片を0.8%のTAEアガロースゲル上で電気泳動して分離した後、サザン法に従ってナイロン膜上に移す。

移した断片を分子ハイブリダイゼーションで分析する。この

ある。

断片の全体配列が配列No.2である。

こうして決定された断片 VS1の1189塩基のヌクレオチドをデータベース「Genebank」および「EMBL」と比較したが、現在公知の配列に類似のものは見出せなかった。

実施例2本発明の核酸配列をプローブとして使用したサザン法によるDNA分析

本試験で用いたバクテリアの符号リストは以下の通り:

カンピロバクター:

- C. jejuni CIP 70.2
- C. coli CIP 70.80
- C. lari CIP 102722
- C. fetus subsp. fetus CIP 5395
- C. fetus subsp. venerealis CIP 5829
- C. hyointestinalis C120
- C. curvus (Hopital des Enfants, Bordeaux)
- C. sputorum subsp. sputorum CCUG 9728
- C. sputorum subsp. bubulus CIP 53103
- C. concisus 18688
- C. faecalis CIP 12014

カンピロバクター以外:

- Escherichia coli HB101
- Helicobacter pylori CIP 101260
- Salmonella typhimurium CJ 53
- A. cryaerophilus CCUG 1780

実施例で使用したプローブは断片 VS2 (配列No.1の) と、断片 VS1 を酵素 Bgl II で加水分解して得られる断片 VS3 とで、これら2つのプローブは³²Pでラベル化されている。

プローブVS2はC. jejuni由来のDNAを特異的に検出し、その他のカンピロバクター種のゲノムDNAとはハイブリダイズしない。

プローブVS3はC. jejuni由来のDNAを検出すると同時にC. coli ゲノム上のDNA断片とも極めて強くハイブリダイズする。このクロスハイブリダイゼーションは16時間暴露させた後のみ検出可能である。一方、C. jejuni 由来のDNAはわずか15分の暴露後に検出された。

これらの結果から、プローブ VS1 (配列No.2) はそれ以外の属のバクテリア由来のDNAの中でC. jejuni 由来のDNAを特異的に検出し、断片 VS2 (配列No.1) はカンピロバクター属内で正確に同定した場合にC. jejuni を特異的に認識するという結論が導かれる。

実施例3本発明の核酸の塩基配列からのプライマーを用いたC. jejuni 由来のDNAのインビトルでの酵素増幅プライマーの選択

PCRの特異性を決定するのは基本的にオリゴヌクレオチドプライマーの3'末端であることは分かっている (W. Innis et col., PCR Protocols, Academic Press Inc.)。従って、この3'領域が増幅すべき目標物に対して完全に特異的であることが重要である。

カンピロバクターのゲノムのグアニンおよびシトシンの比率は非常に小さいので (G+Cで28~30%)、3'末端がG+Cを

多く含むプライマーは高い特異性を示すと考えられた。

本発明者らは、VS1 配列中に G + C を多く含むものを探した結果、VS1 中に一度だけ存在した。この領域からプライマーの配列を決め、長さが約 20 スクレオチドとなるように終了させた。

オリゴヌクレオチドプライマーの合成

VS1 配列に由来する Oligo VS15 および Oligo VS16 と名付けた上記の配列を有する長さがそれぞれ 21 および 22 スクレオチドのプライマーをホスホラミダイト (phosphoramidites) を基礎にしたミリポア (Millipore) 社の自動装置「サイクロンプラス (Cyclone Plus)」で合成した。合成後、オリゴヌクレオチド溶液を試験管に移し、濃縮した水酸化アンモニウム中で 55℃ で 16 時間培養した。オリゴヌクレオチドをエタノールで沈殿させた後、ケーキを 70% のエタノールで洗浄し、乾燥し、最後に 1 ml の滅菌蒸留水に懸濁した。各プライマーの濃度は分光光度計で測定した。

増幅

増幅法として、例えばサイキ達の手順に従ったインビトロ酵素増幅法 (PCR) を用いた (Saiki et al., Science, 1988, 239, 487-491)。この方法では、1 μ M のオリゴヌクレオチド Oligo VS15 および Oligo VS16 と、異なるカンピロバクター株に由来する DNA 30-100ng と、0.5 ユニットの Taq ポリメラーゼと共に用いて、バッファー (25mM の KCl, pH 8.5 のトリス塩酸 20mM、塩化マグネシウム 1.5mM、デオキシリボヌクレオチドトリホスフェート 200 μ M および牛血清アルブミン 100 μ M / ml を含む) 中で最終的な反応容量を 50 μ l にして行う。

PCR 法の各段階でのパラメータは以下のように選択した：94℃ で 5 分、60℃ で 1 分、72℃ で 1 分、次いで (94℃ で 1 分、

60℃ で 1 分、72℃ で 1 分) を 28 回、そして最終サイクルを 94℃ で 1 分、60℃ で 1 分、72℃ で 5 分。自動装置を用いてこれを 30 サイクルを行う。最終サイクル後、分析まで試料を 4℃ に維持する。

増幅させた試料のアガロースゲル上での電気泳動分析

増幅させた試料 10 μ l を、1 μ g / ml のエタジウム臭素を含む TBE バッファー (0.04M のトリス酸、0.001 M の EDTA) 中で 2% アガロースゲル上に添加する。増幅させた断片を UV 下で視覚化し、ポラロイド (Polaroid 667) フィルムを用いてゲルを撮影する。

カンピロバクター由来の各種 DNA と、カンピロバクター属に属さないバクテリア由来の各種 DNA と、プライマー Oligo VS15 および Oligo VS16 とを用いて得られた結果を比較した。このプライマーペアを用いて増幅させた断片に期待される理論上の長さは 358 塩基対である。

そのような断片は *C. jejuni* から抽出された DNA のみで得られる。

以下の株：*C. coli*、*C. lari*、*C. fetus subsp. fetus*、*C. fetus subsp. venerealis*、*C. hyointestinalis*、*A. cryaerophilus*、*C. sputorum subsp. sputorum*、*C. sputorum subsp. bubulus*、*C. concisus*、*C. faecalis*、*B. coli*、*H. pylori*、*S. typhimurium*、*C. curvus* および人の細胞から抽出した DNA を分析したものでは、上記の期待されるサイズの断片の増幅は見られない。

C. fetus subsp. fetus の場合、分子量の大きい断片が増幅されたが非特異的であった。すなわち、ナイロン膜に移した後のこの断片は 32 P でラベル化した VS1 プローブとハイブリダイズしない。

さらに、ホロホロチオウから単離した 15 の *C. jejuni* 株で上記 PCR 法で *C. jejuni* の同定テストをした。株を継代培養した後に DNA を抽出し、増幅した。株は全て *C. jejuni* と同定され、これは予め行った生化学試験と一致した。

PCR テストの感度の決定

上記オリゴヌクレオチドペアを用いて PCR 法で *C. jejuni* の DNA の検出時の絶対的閾値を求めるために、*C. jejuni* バクテリア懸濁液の 10 倍に希釈した PCR による増幅を行った。増幅は 40 サイクル行い、各サイクルは上記条件と同じにし、希釈液を適当な溶菌バッファーと混合した後、熱処理 (65℃ で 15 分間、続いて 95℃ で 10 分間培養) した。溶菌バッファーの組成は以下の通り：トリス塩酸 10mM、EDTA 1mM、pH 8 の 0.5% Tween 20、0.5% Nonidet-P40 および 500 μ g / ml のプロテイナーゼ K。

溶菌で使ったものと同じ各希釈液の 100 μ l 量をカンピロバクター用培地を入れたペトリ皿に広げ、48 時間培養後にコロニーを数えた。これらの条件下での検出限界は 7 バクテリアであった。

各希釈液 10 μ l を増幅する PCR 法での検出限界は統計的に 1 バクテリアである (理論上の希釈は、 3.5×10^7 バクテリア / 100 μ l \sim 3.5 バクテリア / 100 μ l で、それぞれ 100 μ l 当たりのペトリ皿のバクテリアカウント値 2.5×10^7 、 10^6 、 10^5 、 1.5×10^4 、560、32、7 および 0 に対応する)。

結論として、このプライマーペアによって *C. jejuni* 種を特異的に検出できることは重要であり、それによって *C. jejuni* に感染した患者や生物試料から単離したものを同定することができ、臨床細菌学および獣医学の分野で使用できる。

本発明による *C. jejuni* の検出方法は上記のオリゴヌクレオ

チドプローブを用いて食品 (チキンスカロッピーニ、牛肉、牛乳、水) 中の *C. jejuni* の存在を調べるのに使用することもできる。この場合にはバクテリアの溶菌前に低速遠心分離によって粗食物組織を除去する必要がある。そうすることによって PCR テストの結果を向上させ、増幅反応の阻害に起因して誤って陰性と判断する危険を避けることができる。

配列リスト

I 一般情報

- (1) 出願人 : バスツール研究所
- (2) 発明の名称 :
カンピロバクター・ジュニ (*Campylobacter jejuni*)
- のゲノムの核酸塩基配列と特異的にハイブリダイズ
するヌクレオチド配列
- (3) 配列の数 : 4

II 配列No. 1に関する情報:

配列特性:

タイプ : ヌクレオチド
長さ : 147 塩基対
鎖の数 : 一本鎖
形状 : 直線
分子タイプ : DNA
生物体 : *Campylobacter jejuni*
名称 : VS2
配列:

```

10      20      30      40      50
AAGCTTGTGA TACTTTTAAG TGCTATAGAA AGTGAAAATG AAATTTCTTT

60      70      80      90      100
AGCAGGCATA TATAGAGCGT ATTGTTCCAA ATTGATTTA AAGAATGAAA
*****

110     120     130     140
TTTTAGAAATG GGGTCTTAAA ATATTTAAAA ACAATATGC CTTAAAAA

```

```

460     470     480     490     500
AAATCAAATC TTTTATTAT AAAAAATCT TTTGAAGATA TTGTTATGAT

510     520     530     540     550
TTCTAAATTA GCCAAGAAA ATGATTTTAA ATTTTGGTTT AGTAATGAAA

```

```

560     570     580     590     600
CAAATCTTAG TTTCCAAATT GTTCACCAC TTCATTTTAA TATTGCCATT

610     620     630     640     650
ATTTTAAGTT CTTTACAAA TTTAAATCTT ATTTTATGCA ATTTTATGCA

```

```

660     670     680     690     700
ACTTTTGTAT GATAAAATTT ATTTAAGGTT TGAATATGAT AATATTATCA

710     720     730     740     750
GTGATGAGCA AAAACTAAAA CTTTGTGAGC TTTTAAATTC AAATCTTCTT

```

```

760     770     780     790     800
GGTTTAAATT TGAAAAAAT TAAAAAGCCA ATCATTAAAA AAGAGGAGTT

```

```

810     820     830     840     850
AAAATTAGAC TTAACCTATT CTAAAAATGA TGCCAAATTA GGTCTTAATA

```

```

860     870     880     890     900
CTAAGATCA GCAAGGTTTA ATGGCGTATT TGATGAATGT TTTTAATGAA

```

```

910     920     930     940     950
CTTGAACCTG TTTTATGTGC AGCAAAATTT CAAACCATTA GACAAAGGAC

```

```

960     970     980     990     1000
GGGTAAATTT TTTATTTTTC AAAAGAAATGA AAAATTAGAA CATAGCGAGC

```

```

1010    1020    1030    1040    1050
AAAAGTTAGT TAATTTATTA ATAAGTGAGT AAAAAAATGT GTGGAATCGT

```

```

1060    1070    1080    1090    1100
AGGCTATATA GGAAATAATG AAAAAAACA AATTATACTA AATGGACTTA

```

III 配列No. 2に関する情報:

配列特性:

タイプ : ヌクレオチド
長さ : 1.189 塩基対
鎖の数 : 一本鎖
形状 : 直線
分子タイプ : DNA
生物体 : *Campylobacter jejuni*
名称 : VS1

配列:

```

10      20      30      40      50
AAGCTTGTGA TACTTTTAAG TGCTATAGAA AGTGAAAATG AAATTTCTTT

60      70      80      90      100
AGCAGGCATA TATAGAGCGT ATTGTTCCAA ATTGATTTA AAGAATGAAA
*****

110     120     130     140     150
TTTTAGAAATG GGGTCTTAAA ATATTTAAAA ACAATATGC CTTAAAAAGAT
*****

160     170     180     190     200
CTTGTAGAAA AAGAAGATAT ATACAATCCT ATTGTTGTAA GTAGTTTGGT

210     220     230     240     250
TTCTAAGCTA GAAAATTAG AAAATTITAG GCTTTATAT ACTTTAACTT

260     270     280     290     300
GGCTAAAGGC TAAGGCTTAA AATTATAATG CTTTATTTT TAGACTTCTT

310     320     330     340     350
GATAAACTTT TAGAAAAGC AAAACAAGGT TTTGAAGATG AAAATCTACT

360     370     380     390     400
TGAAGAAAGT GCAAGAAGGG TAAAAAAGA ATTAACACTT AAAAGAAGTA

410     420     430     440     450
AGATTTTCTT AGAGCAAGAT GAAATTTTGC AGGATAAAAT CATACATATC
*****

```

```

1110    1120    1130    1140    1150
AAGAATTAGA ATATCGTGGC TATGATAGTG CGGGTATGCG AGTGATGCAA

```

```

1160    1170    1180
GAAGGCGAAC TTAGTTTTTT TAAAGCTGTA GGAAAGCTT

```

IV 配列No. 3に関する情報:

配列特性:

タイプ : ヌクレオチド
長さ : 21塩基
鎖の数 : 一本鎖
形状 : 直線
分子タイプ : DNA
生物体 : *Campylobacter jejuni*
名称 : Oligo VS15

配列:

*GAA TGA AAT TTT AGA ATG GGG *

V 配列No. 4に関する情報:

配列特性:

タイプ : ヌクレオチド
長さ : 22塩基
鎖の数 : 一本鎖
形状 : 直線
分子タイプ : DNA
生物体 : *Campylobacter jejuni*

名称 : Oligo VS16

配列 :

5'-GAT ATG TAT GAT TTT ATC CTGC-3'

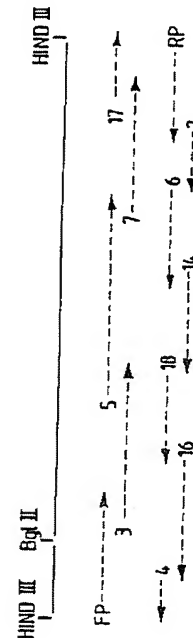


FIG.1

国際調査報告

Int. Search Report
PCT/FR 94/00122

4. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 5 C12Q1/68 C07H21/03 C07H21/04 C12N15/63	
5. FIELD(S) SEARCHED	
6. MULTIPLE SEARCHED SYSTEMS (CLASS SEARCHED SYSTEMS FOLLOWED BY CLASSIFICATION SYSTEMS) IPC 5 C12Q	
7. DOCUMENTS SEARCHED OTHER THAN THOSE DOCUMENTS REFERRED TO IN THE CLASSIFICATION SYSTEMS	
8. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Relevance to class No.
X	J CLIN MICROBIOL 30 (10), 1992, 2613-2619, COHEN: JCM12W ISSN: 0095-1137 & - (C) FILE BIOSIS CYTOPO 8 A et al 'SPECIFIC DETECTION OF CAMPYLOBACTER -JENUJI AND CAMPYLOBACTER -COLI BY USING POLYMERASE CHAIN REACTION.' see the whole document
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 15, no. 302 (C-0855) & JP.A, 03 112 498 (SHINADZU CORP) 14 May 1991 see abstract
9. OTHER INFORMATION	
10. DATE OF THE SEARCH REPORT	
11. NAME AND ADDRESS OF THE SEARCHING AGENCY	
12. NAME AND ADDRESS OF THE INVENTOR	

国際調査報告

Int. Search Report
PCT/FR 94/00122

C/Classified DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Relevance to class No.
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH vol. 14, no. 15, 1986, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 6115 - 6128 JASLONSKI ET AL. cited in the application see the whole document
A	JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY vol. 27, no. 2, February 1989, WASHINGTON US pages 321 - 326 CHEVRIER ET AL. 'Identification and classification of Campylobacter strains by using nonradioactive DNA probes' cited in the application see the whole document
A	ZENTRALBLATT FÜR BAKTERIOLOGIE vol. 272, 1989, STUTTGART, DE pages 186 - 190 ZHOU AND WANG 'Application of a biotin labelled DNA probe to detect Campylobacter' cited in the application
A	MO.A.85 04422 (INTEGRATED GENETICS) 31 July 1986

国際調査報告

PCT/FR 94/00122			
Patent document (date of receipt)	Publication date	Patent family number(s)	Publication date
WO-A-8504422	31-07-86	US-A- 4785086 EP-A- 0208772	15-11-88 21-01-87

Form PCT/FR 94/00122 (to be filled in by the applicant)

国際調査報告

PCT/FR 94/00122			
A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 5 C12Q1/68 C07H21/00 C07H21/04 C12N15/63			
B. DOMAINE SUR LEQUEL LA RECHERCHE A PORTÉ CIB 5 C12Q			
C. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS			
Category	Description des documents pertinents, avec, si nécessaire, l'abrégé des passages pertinents	No. des introductions utiles	
X	J CLIN MICROBIOL 30 (10), 1992, 2613-2619. CODEN: JCMIDW ISSN: 0095-1137 6 - (C) FILE 810315 OYOFO S A et al 'SPECIFIC DETECTION OF CAMPYLOBACTER -JEJUNI AND CAMPYLOBACTER -COLI BY USING POLYMERASE CHAIN REACTION.' voir le document en entier	1-14	
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 15, no. 302 (C-0855) & JP, A, 03 112 498 (SHIMADZU CORP) 14 Mai 1991 voir abrégé	1-14	
[X] Voir la note de lecture C pour le 3e et le 4e des documents [X] Les documents de l'état de la technique sont indiqués en abrégé			
<p>*A* documents pertinents l'un général de la technique, les autres des particularités pertinentes</p> <p>*T* documents pertinents l'un général de la technique, les autres des particularités pertinentes</p> <p>*C* documents pertinents l'un général de la technique, les autres des particularités pertinentes</p> <p>*L* documents pertinents l'un général de la technique, les autres des particularités pertinentes</p> <p>*O* documents pertinents l'un général de la technique, les autres des particularités pertinentes</p> <p>*P* documents pertinents l'un général de la technique, les autres des particularités pertinentes</p> <p>*A* documents pertinents l'un général de la technique, les autres des particularités pertinentes</p>			
Date à laquelle la recherche internationale a été effectuée		Date d'expiration du présent rapport de recherche internationale	
20 Mai 1994		15-06-1994	
Nom et adresse postale de l'administrateur chargé de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.O. Box 1, 4833 Postbus 1 NL-2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-5000, Tlx 31 421 300 01 Fax (+31-70) 340-5001		Fonctionnaire autorisé Molina Galan, E	
Formulaires PCT/FR 94/00122 (à remplir par le demandeur)			

国際調査報告

PCT/FR 94/00122			
C. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS			
Category	Description des documents pertinents, avec, si nécessaire, l'abrégé des passages pertinents	No. des introductions utiles	
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH vol. 14, no. 15, 1985, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 6115 - 6128 JABLONSKI ET AL. cité dans la demande voir le document en entier	1-8	
A	JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY vol. 27, no. 2, Février 1989, WASHINGTON US pages 321 - 326 CHEVRIER ET AL. 'Identification and classification of Campylobacter strains by using nonradioactive DNA probes' cité dans la demande voir le document en entier	14	
A	ZENTRALBLATT FÜR BAKTERIOLOGIE vol. 272, 1989, STUTTGART, DE pages 186 - 190 ZHOU AND WANG 'Application of a blotin labelled DNA probe to detect Campylobacter' cité dans la demande		
A	WO-A-86 04422 (INTEGRATED GENETICS) 31 Juillet 1986		

Formulaires PCT/FR 94/00122 (à remplir par le demandeur)

国際調査報告

PCT/FR 94/00122			
Déposé le	Date de publication	Numéro(s) de la famille de brevets	Date de publication
WO-A-8504422	31-07-86	US-A- 4785086 EP-A- 0208772	15-11-88 21-01-87

Formulaires PCT/FR 94/00122 (à remplir par le demandeur)